

Konstruksi Kandidat Gen *AVI Begomovirus* pada pBI121 dan Introduksinya ke dalam Tembakau Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*

Tri J. Santoso^{1*}, Muhammad Herman¹, Sri H. Hidayat², Hajrial Aswidinnoor³, dan Sudarsono³

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: trijsant@yahoo.com

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Telp. (0251) 8629346; Faks. (0251) 8629352

³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Telp. (0251) 8629346; Faks. (0251) 8629352

Diajukan: 10 Agustus 2010; Diterima: 28 Januari 2011

ABSTRACT

Construction of Begomovirus AVI Gene Candidate into pBI121 and Its Introduction into Tobacco by using *Agrobacterium tumefaciens* Vector. Tri J. Santoso, Muhammad Herman, Sri H. Hidayat, Hajrial Aswidinnoor, and Sudarsono. Infection of Begomovirus has caused leaf curl disease in tomato. This infection has significantly impact on yield losses of tomato production. Recently, in Indonesia there was no effectively way to control this disease. The use of resistant tomato variety is one of strategies to control this virus. Genetic engineering technology gives an opportunity to develop the transgenic tomato resistant to Begomovirus through pathogen derived resistance (PDR) approach. The objectives of this study were to construct the Begomovirus AVI candidate gene in the pBI121 and to introduce the construct into tobacco plant genome through *Agrobacterium tumefaciens* vector. A series activities in gene construct have been conducted include PCR amplification of AVI gene using a pair of specific primer, cloning the gene into pGEM-T easy, transformation of the clone into *Escherichia coli* DH5 α competent cell, construct the gene into pBI121, and transform the construct into *A. tumefaciens*. Leaf segments of *in vitro* tobacco plant were transformed by co-cultivation with *A. tumefaciens* containing *ToLCV-AVI* construct. In the research activity, Indonesian Begomovirus AVI gene was successfully amplified and inserted in expression vector plasmid pBI121. Tobacco transformants carrying kanamycin-resistant gene (*nptII* gene) were regenerated and established in the glasshouse. Those transformant plants are expected containing the AVI gene.

Keywords: AVI gene, Begomovirus, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium tumefaciens*, coat protein.

ABSTRAK

Konstruksi Kandidat Gen AVI Begomovirus pada pBI121 dan Introduksinya ke dalam Tembakau Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Tri J. Santoso, Muhammad Herman, Sri H. Hidayat, Hajrial

Aswidinnoor, dan Sudarsono. Infeksi Begomovirus telah menyebabkan penyakit keriting daun pada tanaman tomat. Infeksi ini secara signifikan mengakibatkan kehilangan hasil produksi tomat. Saat ini, di Indonesia tidak ada cara yang efektif untuk mengendalikan penyakit ini. Penggunaan varietas tomat tahan merupakan salah satu strategi untuk mengendalikan virus ini. Teknologi rekayasa genetik memberikan sebuah peluang untuk mengembangkan tanaman tomat transgenik tahan Begomovirus melalui pendekatan *pathogen derived resistance* (PDR). Tujuan studi ini adalah untuk mengkonstruksi gen kandidat AVI Begomovirus pada pBI121 dan mengintroduksi konstruk tersebut ke dalam genom tanaman tembakau melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk mempelajari fungsi gen. Serangkaian aktivitas untuk konstruksi gen telah dilakukan yang meliputi amplifikasi PCR gen AVI menggunakan sepasangan primer spesifik, kloning gen tersebut ke pGEM-T easy, transformasi klon ke sel kompeten *Escherichia coli* DH5 α , konstruksi gen ke pBI121 dan transformasi konstruk ke *A. tumefaciens*. Eksplan potongan daun tanaman tembakau *in vitro* ditransformasi melalui ko-kultivasi dengan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk *ToLCV-AVI*. Pada penelitian ini, gen AVI Begomovirus Indonesia telah berhasil diamplifikasi dan disisipkan ke dalam plasmid vektor ekspresi. Transforman tembakau yang membawa gen ketahanan kanamisin (*npt-II*) telah dihasilkan dan ditanam di rumah kaca. Tanaman-tanaman transforman tersebut diharapkan mengandung gen AVI.

Kata kunci: Gen AVI, Begomovirus, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium tumefaciens*, coat protein.

PENDAHULUAN

Serangan penyakit keriting daun pada tanaman tomat dan cabai yang disebabkan oleh infeksi *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), salah satu anggota *Begomovirus*, telah dilaporkan di berbagai daerah di Indonesia (Aidawati *et al.*, 2005; Hidayat *et al.*, 2006). Penurunan hasil akibat serangan penyakit keriting daun pada tanaman tomat di daerah Bogor, Jawa Barat dan sekitarnya dilaporkan dapat mencapai 50-

70% (Sudiono *et al.*, 2001). Serangan penyakit keriting daun juga dilaporkan dapat menyebabkan penurunan hasil hingga 50-100% (AVRDC, 2003) dibandingkan dengan tanaman tomat yang sehat.

Beberapa pendekatan telah dilakukan untuk mengendalikan *Begomovirus* yang menginfeksi tanaman tomat, tetapi hanya sedikit yang terbukti efektif. Usaha untuk mengendalikan kutu kebul (vektor *Begomovirus*) secara biologi juga telah dilakukan, akan tetapi hasilnya tidak memuaskan (Mason *et al.*, 2000). Sampai saat ini belum ada bahan kimia yang dapat diaplikasikan secara langsung untuk mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh virus tersebut. Penggunaan varietas tahan merupakan cara yang tepat untuk mengendalikan virus karena metode ini relatif lebih aman dan murah apabila dibandingkan dengan metode pengendalian yang lain (Hanson *et al.*, 2000).

Usaha untuk memperoleh ketahanan genetik terhadap *Begomovirus* terutama untuk TYLCV telah dilakukan. Beberapa peneliti telah mencari gen ketahanan dan toleransi terhadap TYLCV di antara spesies *Lycopersicon* liar dan telah menemukan beberapa gen yang menjanjikan, di antaranya pada spesies *L. chilense* Dun, *L. hirsutum* Dun, dan *L. peruvianum* (L.) Mill (Pico *et al.*, 1998; Vidavsky dan Czosnek, 1998). Akan tetapi, melalui pemuliaan konvensional hanya beberapa galur dan varietas saja yang telah dihasilkan. Padahal, di daerah sentra produksi tomat di beberapa negara di dunia, tanaman tomat yang dikembangkan masih sangat rentan terhadap berbagai strain *Begomovirus* (Mason *et al.*, 2000). Selain itu, kultivar-kultivar yang toleran justru mendukung replikasi virus dan dapat menjadi sumber inokulum untuk tanaman yang rentan (Lapidot *et al.*, 2001). Untuk kasus Indonesia, sumber gen ketahanan untuk mengendalikan *Begomovirus* belum ditemukan pada koleksi plasma nutfah tomat. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan lain untuk pengembangan kultivar tomat tahan penyakit keriting yang disebabkan oleh *Begomovirus*.

Alternatif konsep ketahanan yang berasal dari patogen (*pathogen-derived resistance*, PDR) yang dapat digunakan untuk pengembangan varietas tomat tahan penyakit keriting (Sanford dan Johnson, 1985; Dasgupta *et al.*, 2003). Pendekatan PDR ini memanfaatkan elemen genetik yang dapat berupa gen utuh atau bagian gen dari genom virus kemudian diklon dan digabungkan dengan sekuen pengendali (promotor dan terminator) dan diintroduksi ke tanaman melalui transformasi genetik tanaman, sehingga akan mempengaruhi satu atau beberapa tahap penting dalam siklus hidup virus. Pemanfaatan gen selubung

protein (*coat protein gene*) merupakan salah satu contoh dari pendekatan PDR ini (Raj *et al.*, 2005).

Gen *AV1* menyandikan protein selubung (*coat protein*) dan merupakan gen yang terletak pada utas *viral sense* dari *Begomovirus* monopartite termasuk *tomato (yellow) leaf curl virus* (Harrison, 1985). Produksi protein selubung diregulasi oleh gen *AC2*. Protein selubung mempunyai beberapa fungsi dan merupakan dasar dari metode serologi untuk deteksi dan identifikasi *Begomovirus*. Gen penyandi protein selubung virus (*AV1*) diisolasi dari virus untuk memperoleh resistensi non konvensional terhadap virus dan telah terbukti efektif untuk mengendalikan geminivirus pada tanaman (Sinisterra *et al.*, 1999; Raj *et al.*, 2005).

Analisis fungsional ekspresi gen *AV1 Begomovirus* untuk memperoleh tanaman tomat tahan terhadap virus dapat dilakukan dengan mengintegrasikan gen *AV1* ke dalam genom dan meregenerasikan tanaman transgenik. Tanaman tembakau merupakan tanaman model yang dapat digunakan untuk mempelajari tujuan tersebut karena regenerasi tanaman tembakau sangat mudah dilakukan. Selain itu, tanaman tembakau juga merupakan salah satu inang dari *Begomovirus* sehingga mempermudah untuk pengujian ekspresi gen melalui infeksi virus (Lazarowitz dan Lazdins, 1991). Beberapa penelitian untuk mempelajari gen-gen dari virus untuk memperoleh sifat ketahanan telah dilakukan (Sinisterra *et al.*, 1999; Mubin *et al.*, 2007).

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan konstruksi kandidat gen *AV1 Begomovirus* pada plasmid pBI121 dan mengintroduksi transgen tersebut ke dalam genom tanaman tembakau (sebagai model) menggunakan *A. tumefaciens* untuk mempelajari fungsi gen tersebut.

BAHAN DAN METODE

Kloning Kandidat Gen *AV1* pada pGEM-T Easy

Gen *AV1 Begomovirus* dari isolat Brastagi dan Kaliurang diamplifikasi menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik mengikuti prosedur yang dikembangkan Liu *et al.* (2006). Amplifikasi gen *AV1* dilakukan menggunakan sepasang primer spesifik gen *AV1* (CPPROTEIN-V1 dan CPPROTEIN-C1) yang dirancang oleh peneliti yang sama. Urutan basa dari primer CPPROTEIN-V1 adalah 5'-TAATTCTAGATGTCGAAGCGACCCGCCGA-3' (mengandung situs enzim *Xba*I, ditandai dengan garis bawah) dan primer CPPROTEIN-C1 adalah 5'-GGCCGAATTCTTAATTTGAACAGAATCA-3' (mengandung situs enzim *Eco*RI). Ukuran produk amplifikasi PCR dari gen *AV1* adalah 780 bp. Reaksi

amplifikasi dilakukan dengan total volume 25 µl mengandung 2-5 µl DNA cetakan. Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR (MJ Research) dengan program sebagai berikut: denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 55°C selama 2 menit, dan pemanjangan/sintesis DNA pada suhu 72°C selama 2 menit. Tahapan program PCR tersebut diulang sebanyak 30 siklus. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Fragmen DNA hasil PCR dipurifikasi menggunakan "S.N.A.P DNA purification kit" (Invitrogen) kemudian diligasikan pada vektor pGEM-T easy. Plasmid rekombinan hasil ligasi kemudian ditransformasi ke dalam bakteri *E. coli* DH5α dengan metode CaCl₂ (*heat shock*) dari Sambrook *et al.* (1989). Untuk mengidentifikasi fragmen sudah tersisip ke dalam plasmid maka dilakukan verifikasi plasmid rekombinan dengan memotong plasmid menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, di mana situs restriksi enzim ini pada pGEM-T easy yang hasil pemotongannya dapat memisahkan fragmen sisipan dan vektor.

Konstruksi Gen AV1 pada Vektor Ekspresi pBI121

Fragmen gen AV1 diperoleh dari pemotongan klon pGEM-T easy/AV1 dengan enzim *XbaI-SacI* dan disisipkan ke vektor ekspresi pBI121 yang dipotong dengan enzim yang sama. Hasil ligasi ditransformasikan ke bakteri *E. coli* DH5α dan diseleksi dengan antibiotik kanamisin (100 mg/l). Koloni yang terbentuk ditumbuhkan kembali pada media LB cair dan diisolasi DNA plasmidnya serta diverifikasi kembali dengan enzim restriksi yang sesuai. Proses pemotongan dan ligasi dilakukan sesuai dengan prosedur sebelumnya.

Transformasi Konstruksi Gen AV1 ke *A. tumefaciens*

DNA rekombinan ditransformasikan ke bakteri *A. tumefaciens* strain LBA4404 menggunakan elektroforator (Biorad) dengan prosedur sesuai dengan petunjuk dari manufaktur. Koloni bakteri yang tumbuh pada media YEP diisolasi DNA plasmidnya, diverifikasi dengan enzim restriksi untuk meyakinkan bahwa *A. tumefaciens* telah membawa plasmid rekombinan yang benar.

Bakteri *Agrobacterium* yang membawa konstruksi gen AV1 ditumbuhkan pada media YEP padat yang mengandung 100 mg/l kanamisin selama 2 hari sebelum digunakan. Koloni tunggal bakteri diambil dari cawan petri dan ditumbuhkan pada 5 ml media YEP cair + 100 mg/l kanamisin. Bakteri diinkubasi pada 28°C selama 48 jam dengan penggoyangan 200 rpm. Kultur bakteri diencerkan dengan media MSO cair hingga mencapai nilai 0,5 pada OD 600.

Introduksi Kandidat Gen AV1 ke dalam Tembakau Menggunakan *A. tumefaciens*

Introduksi gen AV1 ke dalam tembakau menggunakan eksplan potongan daun mengikuti prosedur dari Horsch *et al.* (1985). Tanaman tembakau yang digunakan untuk introduksi gen adalah tembakau cv. Samsun. Daun tembakau yang berukuran 2,5-3,5 cm diambil dari perkecambahan *in vitro* dan dipotong-potong melintang menjadi 2-3 potongan persegi untuk digunakan sebagai eksplan. Jumlah seluruh eksplan adalah 273 potong. Eksplan direndam dalam suspensi bakteri *A. tumefaciens* pada cawan petri yang mengandung 30 mM asetosiringon selama 30 menit. Dua puluh eksplan per petri ditanam pada media ko-kultivasi (MS0 dengan vitamin B5 + 100 mM asetosiringon + 30 g/l sukrosa + 3 g/l phytigel dan pH 5,7) dan dikulturkan selama 3 hari pada suhu 27°C di ruang gelap.

Eksplan dipindahkan ke media seleksi (MS dengan vitamin B5 + 0,1 mg/l NAA dan 1 mg/l BA + sukrosa 30 g/l + phytigel 3 g/l dan pH 5,7) dengan penambahan 100 mg/l kanamisin, 50 mg/l cefotaksim dan 500 mg/l karbenisilin. Komposisi media dasar MS seperti pada pustaka. Kultur pada media seleksi diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 27°C dengan fotoperiodisitas cahaya 16 jam terang/8 jam gelap. Eksplan disubkultur setiap 2 minggu. Eksplan/kalus yang bertunas dipindahkan ke media pemanjangan tunas (MS dengan vitamin B5 + 0,1 mg/l BA + sukrosa 30 g/l + phytigel 3 g/l dan pH 5,7) dengan penambahan 100 mg/l kanamisin, 50 mg/l cefotaksim dan 500 mg/l karbenisilin.

Tunas yang terbentuk pada media pemanjangan tunas dipisahkan dari kalus dan dipindahkan ke media perakaran (1/2 MS + Km100Cb100Ct50 + sukrosa 30 g/l + phytigel 3 g/l dan pH 5,7) pada botol selai. Planlet yang terbentuk siap untuk dipindahkan ke pot.

Konfirmasi Keberhasilan Introduksi Kandidat Gen AV1 Berdasarkan Keberadaan Gen *npII*

Isolasi DNA genom total tanaman tembakau transgenik putatif T₀ menggunakan metode yang dikembangkan oleh Doyle dan Doyle (1990) yang telah dimodifikasi dengan penambahan 2% polivinilpyrrolidone (PVP).

Total genom tanaman tembakau transgenik putatif T₀ diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik *npII*. Amplifikasi PCR dilakukan pada volume total reaksi 25 µl yang mengandung 2-5 µl DNA genomik cetakan (template DNA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kloning Kandidat Gen *AVI* pada pGEM-T Easy

Amplifikasi PCR menggunakan asam nukleat total tanaman dan primer spesifik gen *AVI Begomovirus* dari isolat Kaliurang (CP8) dan Brastagi (CP11) menghasilkan fragmen DNA berukuran 780 bp (Gambar 1A). Pemilihan isolat ini berdasarkan dari hasil percobaan sebelumnya di mana kedua isolat tersebut mewakili dua kelompok yang berbeda dari hasil analisis filogenetik delapan isolat *Begomovirus* (Santoso *et al.*, 2008).

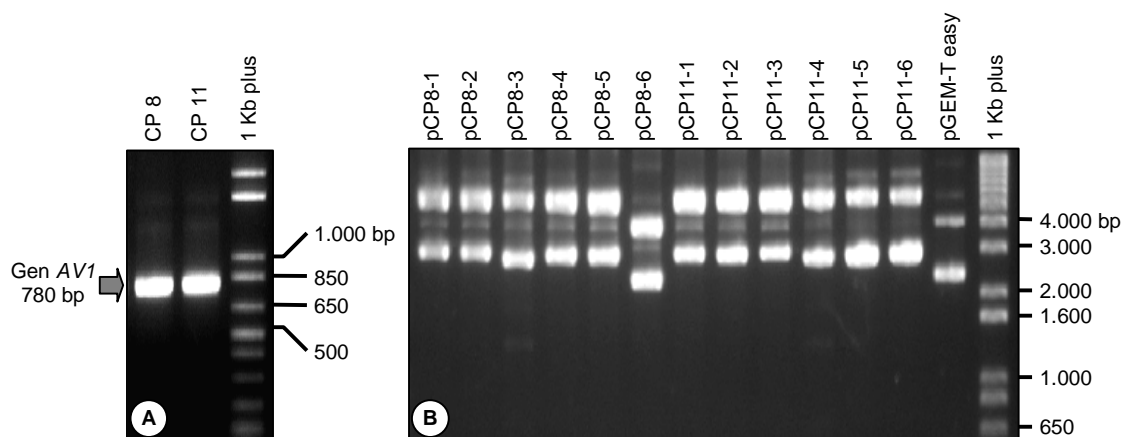
Fragmen gen *AVI* hasil amplifikasi diklon ke vektor pGEM-T *easy* (Promega) yang merupakan vektor untuk kloning fragmen DNA hasil PCR. Tujuan pengklonan fragmen gen *AVI* ke pGEM-T *easy* adalah untuk menyimpan fragmen DNA sehingga mempermudah di dalam memperbanyak fragmen dan pemilihan enzim restriksi yang sesuai untuk kloning. Setelah ditransformasi ke bakteri *E. coli* DH5 α , plasmid rekombinan pCP8 dan pCP11 diisolasi dari koloni tunggal bakteri yang terbentuk. Jumlah koloni tunggal yang terbentuk setelah transformasi adalah sebanyak 68 koloni untuk CP8 dan 17 koloni untuk CP 11.

Sebanyak 12 koloni bakteri yang terdiri dari 6 koloni pCP8 (pCP8-1, -2, -3, -4, -5, dan -6) dan 6 koloni pCP11 (pCP11-1, -2, -3, -4, -5, dan -6) dipilih untuk memverifikasi plasmid rekombinan yang membawa gen *AVI*. Plasmid hasil isolasi dari koloni bakteri dielektroforesis secara langsung dengan gel agarosa 1% dengan kontrol plasmid pGEM-T *easy*. Plasmid rekombinan (pGEM-T *easy* yang telah mengandung sisipan gen *AVI*) diindikasikan dengan ukuran plasmid dalam bentuk *open circular* (pita atas) dan *supercoiled* (pita bawah) yang lebih tinggi dibandingkan dengan

pGEM-T *easy*. Ternyata dari 12 plasmid utuh yang diisolasi dari koloni bakteri tersebut diketahui 11 plasmid merupakan plasmid rekombinan dan hanya 1 plasmid yang tidak membawa plasmid rekombinan, yaitu plasmid yang diisolasi dari koloni pCP8-6 di mana koloni ini mempunyai ukuran pita DNA yang sama dengan pGEM-T *easy* (Gambar 1B).

Salah satu komponen penting di dalam mempelajari ekspresi suatu gen adalah kegiatan kloning dan konstruksi dari gen yang akan diekspresikan tersebut. Pada penelitian ini, gen yang akan dikloning dan dikonstruksi adalah gen *AVI*, yaitu gen yang mengekspresikan protein selubung. Protein selubung adalah suatu protein yang berperan di dalam penentuan spesifisitas penularan virus (Bridson *et al.*, 1990) dan perkembangan gejala (Gardiner *et al.*, 1988). Berdasarkan kenyataan ini, maka melalui strategi pendekatan *pathogen derived resistance* (PDR) gen *AVI* dapat digunakan untuk mentransformasi tanaman inang sehingga memberikan proteksi terhadap infeksi *Begomovirus*. Mekanisme proteksinya adalah bila gen tersebut terekspresi ke dalam tanaman akan terjadi akumulasi protein selubung virus. Mekanisme resistensi ini berperan pada tingkat awal proses replikasi virus, dengan menghalangi proses replikasi secara tidak terkontrol dari partikel virus (Aswidinnoor, 1995). Mekanisme lain yang mungkin terjadi di dalam ketahanan terhadap virus yang dikembangkan melalui pendekatan rekayasa genetika dengan menggunakan gen protein selubung adalah mekanisme pembungkaman gen paska transkripsi (*post transcriptional gene silencing*) (Dasgupta *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini, gen *AVI* dari dua isolat *Begomovirus*, yaitu isolat Kaliurang (diberi kode CP-8) dan isolat Brastagi (CP-11) telah berhasil diamplifikasi



Gambar 1. Elektroforesis pada gel agarosa 1%. A = produk amplifikasi gen *AVI* dari dua isolat *Begomovirus* (CP 8 dan CP11) menggunakan primer spesifik CPPROTEIN-V1 dan CPPROTEIN-C1. B = DNA plasmid rekombinan pCP8 (1-6) dan pCP11 (1-6) hasil isolasi dari koloni tunggal bakteri *E. coli* DH5 α .

menggunakan primer spesifik yang didesain untuk mengamplifikasi gen tersebut. Keberhasilan ini ditandai dengan diperolehnya ampikon yang berukuran sekitar 780 pasangan basa (Gambar 1A). Untuk memfasilitasi pemilihan enzim restriksi yang akan digunakan untuk kloning gen AV1 pada vektor ekspresi maka ampikon gen AV1 tersebut dikloning ke dalam suatu vektor kloning pGEM-T *easy* (Promega). Vektor kloning ini mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya adalah (1) dapat digunakan untuk mengkloning fragmen hasil PCR yang menggunakan enzim DNA polimerase tertentu yang akan menghasilkan fragmen dengan ujungnya mempunyai ekor basa A di mana vektor pGEM-T mempunyai ujung T, (2) vektor ini juga mempunyai *polycloning site* yang akan mempermudah di dalam pemilihan enzim restriksi untuk kloning, (3) vektor ini juga merupakan plasmid yang memiliki kemampuan propagasi tinggi sehingga sangat membantu di dalam perbanyakannya pada sel kompeten seperti *E. coli*.

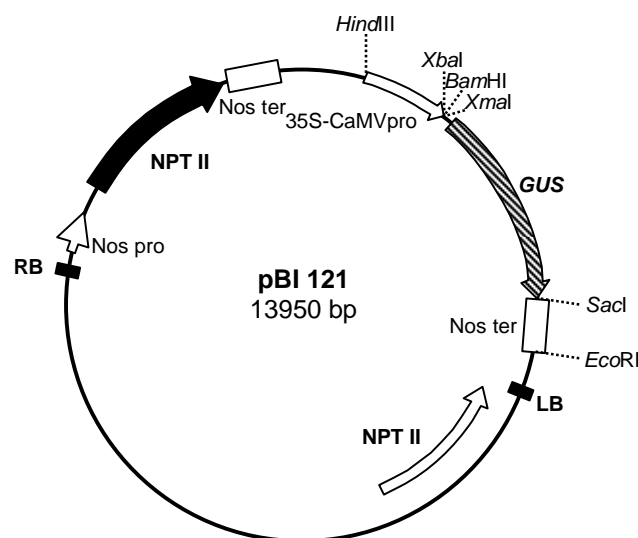
Konstruksi Kandidat Gen AV1 pada pBI121

Untuk mendapatkan fragmen gen AV1 dan vektor ekspresi pBI121 mempunyai ujung yang kohesif sebelum diligasikan maka gen AV1 yang telah diklon pada pGEM-T dipotong dengan 2 enzim restriksi *Xba*I dan *Sac*I. Demikian juga dengan vektor ekspresi pBI121. Enzim restriksi *Xba*I dan *Sac*I hanya akan memotong pada bagian gen *gus* pada vektor plasmid pBI121 namun elemen promoter 35S CaMV dan terminator NOS masih ada (Gambar 2). Bagian gen *gus* yang dipotong inilah nanti yang akan digantikan oleh gen AV1.

Pemotongan plasmid pCP8 dan pCP11 dengan enzim *Xba*I dan *Sac*I dapat menggambarkan orientasi (arah penempelan) dari sisipan gen AV1 pada pGEM-T *easy*. Dari 7 plasmid rekombinan yang dipotong dengan enzim restriksi terdapat lima plasmid yang membawa gen AV1 dengan orientasi yang diinginkan, yaitu pCP8-1, pCP8-3, pCP8-4, pCP11-2, dan pCP11-3 (Gambar 3). Dua plasmid yang lain (pCP8-2 dan pCP11-1) membawa gen AV1 dengan orientasi yang terbalik sehingga ketika dipotong dengan enzim *Xba*I dan *Sac*I, fragmen gen AV1 tidak terpotong karena kedua situs restriksi letaknya jadi berdekatan.

Selanjutnya hasil ligasi antara fragmen sisipan (gen AV1 atau gen *gus*) dan vektor pBI121 ditransformasi ke bakteri *E. coli* DH5a. Jumlah koloni yang terbentuk pada transformasi plasmid rekombinan hasil ligasi antara gen AV1 dan vektor ekspresi pBI121 sebanyak 12 koloni untuk pBI121/AV1-CP8 dan 16 koloni untuk pBI121/AV1-CP11. Setelah diperoleh DNA plasmid dari koloni tunggal bakteri hasil transformasi, dilakukan verifikasi untuk memilih plasmid rekombinan, yaitu memiliki gen AV1 sebagai sisipannya.

Dari delapan koloni tunggal yang mengandung plasmid rekombinan diperoleh empat plasmid rekombinan yang mengandung sisipan gen AV1, masing-masing 2 plasmid rekombinan dari CP8 (pCP8-1-2 dan pCP8-1-3) dan 2 plasmid dari CP11 (pCP11-2-1 dan pCP11-2-2) (Gambar 4). Dari plasmid rekombinan tersebut dapat dibuat peta plasmid yang baru (Gambar 5). Plasmid rekombinan tersebut telah berhasil ditransformasi ke bakteri *A. tumefaciens* dan menghasilkan koloni tunggal bakteri yang siap digunakan untuk transformasi genetik tanaman tembakau.



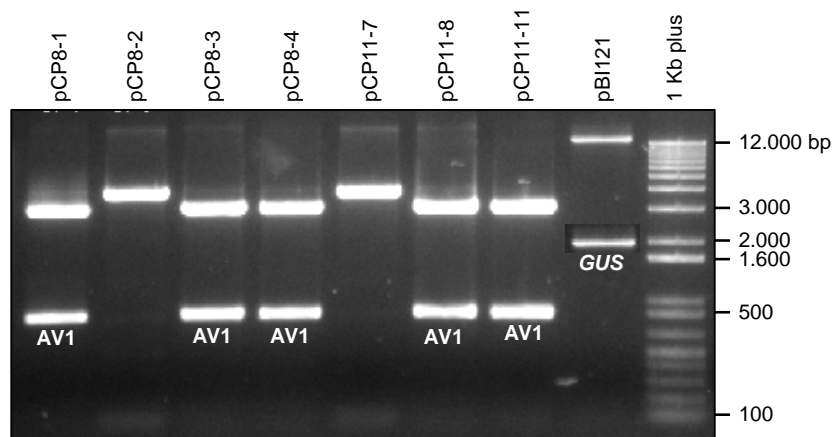
Gambar 2. Peta plasmid biner pBI121 yang membawa gen pelapor *gus* dan gen marker *nptII* pada struktur T-DNA-nya.

Untuk melihat ekspresinya, gen *AVI* disisipkan pada vektor ekspresi pBI121 (Clontech Labs Inc., Palo Alto, CA) yang merupakan vektor ekspresi konstitutif untuk tanaman yang mengandung gen *neomycinphospho-transferase II* (*nptII*) untuk seleksi dan gen pelapor β -glucuronidase (*gus*). Konstruksi gen dilakukan dengan memotong dan mengganti gen pelapor *gus* yang berukuran 2.000 bp dengan gen *AVI* yang berukuran sekitar 780 bp. Proses ligasi standar atau klasik dilakukan dengan cara menggabungkan satu fragmen DNA sisipan linier ke satu DNA vektor (Sambrook *et al.*, 1989). Pada penelitian ini, pendekatan ligasi yang dilakukan adalah dengan “competition approach” di mana ada dua gen sisipan yang digabungkan dengan satu DNA vektor. Dalam hal ini, gen *AVI* dan gen *gus* akan berkompetisi untuk berligasi pa-

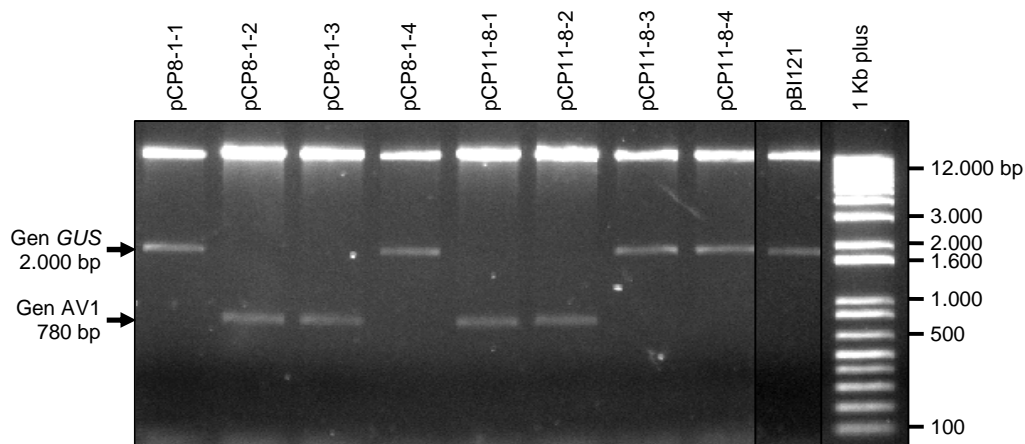
da vektor ekspresi pBI121. Ini dilakukan dengan cara meligasikan vektor ekspresi pBI121 (yang sebelumnya telah dipotong dengan enzim *XbaI* dan *SacI*) dengan fragmen gen *AVI*. Skrining plasmid rekombinan dilakukan dengan memotong kembali plasmid dengan enzim *XbaI* dan *SacI*. Plasmid rekombinan yang diinginkan akan mudah teridentifikasi karena fragmen gen *AVI* (780 bp) dan *gus* (2.000 bp) mempunyai ukuran yang berbeda (Gambar 4).

Introduksi Kandidat Gen *AVI* ke dalam Tembakau Menggunakan *A. tumefaciens*

Introduksi gen *AVI-Begomovirus* ke tanaman tembakau melalui tahapan transformasi genetik dengan bantuan vektor *A. tumefaciens* (Gambar 6) dilakukan 4 kali (dua kali *event* untuk masing-masing



Gambar 3. Elektroforesis fragmen gen *AVI* yang dipotong dari vektor pGEM-T easy dan fragmen gen *gus* dari vektor ekspresi pBI121 dengan enzim restriksi *XbaI* dan *SacI* pada gel agarosa 1%. *AV1* = fragmen gen *AVI* yang berukuran 780 bp; *GUS* = fragmen gen *gus* yang berukuran 2.000 bp.

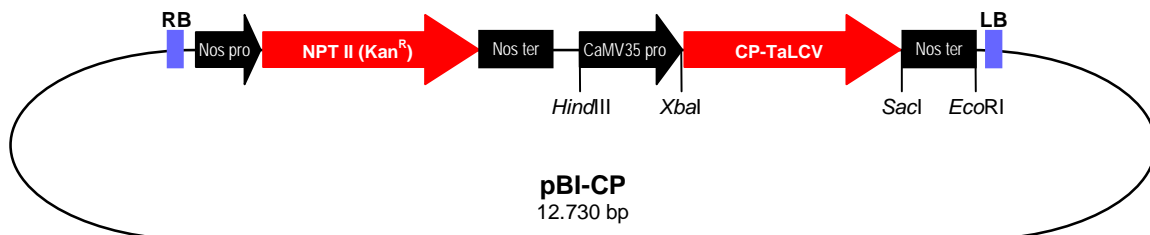


Gambar 4. Elektroforesis hasil verifikasi insersi fragmen gen *AVI* dengan enzim restriksi *XbaI* dan *SacI*. Fragmen gen *gus* ditandai dengan pita DNA berukuran 2.000 bp dan fragmen gen *AVI* ditandai dengan pita DNA berukuran 780 bp.

konstruksi gen CP8/AV1 dan CP11/AV1). Transformasi dilakukan dengan jumlah total eksplan sebanyak 273 potongan daun. Dari empat kali transformasi dihasilkan sebanyak 1.593 tunas yang tahan pada media seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin 100 mg/l dengan rerata tunas per eksplan adalah sebesar 5,84. Setelah dipindahkan ke media perakaran dan diaklimatisasi diperoleh sebanyak 1.399 planlet yang tahan

kanamisin dengan rerata planlet per eksplan adalah 5,12 (Tabel 1). Dari data yang diperoleh, rerata persentase keberhasilan tunas menjadi planlet adalah sebesar 88,52%.

Untuk mempelajari ekspresi gen AV1 dari *Begomovirus* yang menyandikan protein selubung di dalam hubungannya dengan ketahanan terhadap penyakit keriting daun maka gen AV1 diintroduksi ke



Gambar 5. Peta konstruksi plasmid biner pBI-CP yang membawa gen AV1 *Begomovirus* dengan promotor 35S-CaMV dan terminator *nos*, dan gen marker *npII* pada struktur T-DNA.



Gambar 6. Transformasi genetik tembakau dengan gen AV1 melalui vektor *A. tumefaciens*. A = tanaman tembakau *in vitro* sebagai sumber eksplan, B = eksplan potongan daun pada media induksi kalus yang mengandung kanamisin 100 mg/l setelah ko-kultivasi dengan bakteri *A. tumefaciens*, C = eksplan mulai memperlihatkan adanya pertumbuhan tunas, D = eksplan dengan tunas-tunas yang muncul di tempat pelukaan, E = eksplan tidak ditransformasi yang ditumbuhkan pada media seleksi kanamisin 100 mg/l, F = tunas-tunas hasil transformasi pada media perakaran, G = tunas-tunas yang sudah berakar pada media perakaran di tabung reaksi, H = tunas-tunas yang sudah berakar pada media perakaran di botol, I = planlet yang sudah diaklimatisasi pada media tanah pada bak plastik.

dalam genom tanaman tembakau. Integrasi gen *AVI* ke dalam tanaman model ini diharapkan akan memberikan informasi mengenai keefektifan gen tersebut untuk mengendalikan penyakit keriting daun yang disebabkan oleh infeksi *Begomovirus* tersebut. Tanaman model tembakau selama ini telah terbukti efektif untuk kegiatan rekayasa genetika karena tanaman tersebut mempunyai kompetensi regenerasi dan transformasi yang tinggi. Selain itu, tanaman tembakau juga merupakan salah satu tanaman inang yang dapat diinfeksi oleh *Begomovirus* sehingga akan memudahkan di dalam pengujian ketahanan terhadap virus. Beberapa penelitian yang mempelajari ekspresi gen untuk ketahanan terhadap virus melalui transformasi genetik menggunakan tanaman tembakau telah dilaporkan (Sinisterra *et al.*, 1999; Mubin *et al.*, 2007).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman tembakau mempunyai kompetensi transformasi dan regenerasi yang tinggi. Kompetensi transformasi diindikasikan oleh tingginya jumlah tunas yang dihasilkan pada media seleksi yang mengandung antibiotik kana-

misin 100 mg/l dengan rerata jumlah tunas per eksplan adalah 5,84 (Tabel 1). Kompetensi regenerasi tanaman tembakau yang tinggi diindikasikan oleh kemampuan eksplan beregenerasi membentuk tunas dan akhirnya tumbuh menjadi planlet dengan persentase tunas menjadi planlet adalah 88,52% (Tabel 1). Perlakuan transformasi dengan bakteri *A. tumefaciens* dan tekanan seleksi dari antibiotik kanamisin (100 mg/l) pada media regenerasi tidak mempengaruhi kemampuan eksplan untuk membentuk tunas.

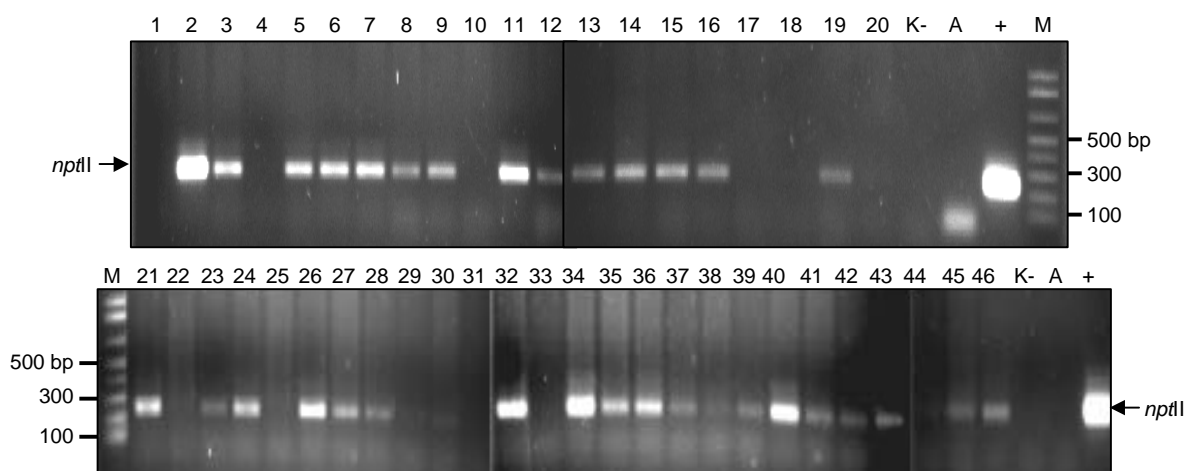
Konfirmasi Keberhasilan Introduksi Konstruksi Kandidat Gen *AVI* Berdasarkan Keberadaan Gen *nptII*

Amplifikasi gen *nptII* dengan PCR pada 46 tanaman tembakau transgenik putatif generasi T₀ menggunakan primer spesifik menghasilkan 35 tanaman (22 tanaman dari konstruksi CP8/*AVI* dan 13 tanaman CP11/*AVI*) yang mengandung gen *nptII* (Gambar 7). Hal ini diindikasikan dengan terbentuknya pita DNA berukuran sekitar 250 bp. Persentase tanaman yang

Tabel 1. Jumlah tunas dan planlet yang dihasilkan serta persentase tunas menjadi planlet pada transformasi genetik tembakau dengan gen *AVI* *Begomovirus* melalui vektor *A. tumefaciens*.

Konstruksi gen	Transformasi ke-	Jumlah eksplan	Jumlah tunas*	Jumlah planlet**	Persentase tunas menjadi planlet***
CP8/ <i>AVI</i>	1	62	332 (5,44)	298 (4,88)	89,76
	2	62	323 (5,38)	290 (4,83)	89,78
CP-11/ <i>AVI</i>	1	90	627 (7,29)	532 (6,18)	84,85
	2	59	311 (5,36)	279 (4,81)	89,71
Total		273	1593	1399	-
Rerata		68,25	398,25 (5,84)	349,75 (5,12)	88,52

*angka dalam kurung menunjukkan jumlah tunas/eksplan, **angka dalam kurung menunjukkan jumlah planlet/eksplan, ***persentase tunas menjadi planlet dihitung berdasarkan jumlah planlet yang terbentuk dibagi dengan jumlah tunas yang terbentuk dikalikan dengan 100%.



Gambar 7. Elektroforesis gel hasil amplifikasi gen *nptII* pada 46 tanaman tembakau transgenik putatif generasi T₀ menggunakan primer PCR spesifik. Kolom No. 1-46 = sampel tanaman, K- = tembakau non transforman, A = air, + = plasmid, M = 1 Kb plus ladder (*In vitro*).

mengandung gen *nptII* dibandingkan dengan jumlah total tanaman yang dianalisis adalah sebesar 76,1%. Pada kontrol negatif yang digunakan (tanaman tembakau yang tidak ditransformasi dan air) tidak menunjukkan adanya pita hasil amplifikasi (250 bp) (Gambar 7). Hal tersebut menunjukkan bahwa prosedur teknik PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen *nptII* sudah benar dan tidak terdapat kontaminasi oleh DNA dari sampel yang diuji atau DNA dari sumber yang lain.

Salah satu parameter keberhasilan dari teknik transformasi adalah tersisipnya gen yang diinginkan ke dalam genom tanaman. Untuk mendeteksi keberadaan gen pada tanaman transgenik putatif dapat dilakukan dengan analisis molekuler, salah satunya menggunakan teknik PCR. Meskipun teknik ini belum menjamin bahwa transgen telah terintegrasi ke dalam genom tanaman namun teknik ini dapat digunakan untuk skrining awal secara cepat tanaman transgenik putatif. Pada penelitian ini, telah berhasil dideteksi tanaman tembakau transgenik putatif yang membawa gen ketahanan terhadap kanamisin dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik gen *nptII*. Dari 46 tanaman yang diuji PCR, diperoleh 33 tanaman yang positif mengandung gen *nptII*. Gen *nptII* ini berada satu konstruksi dengan gen AV1 pada T-DNA, sehingga diharapkan tanaman yang terdeteksi membawa gen *nptII* juga membawa gen AV1. Selain itu, penggunaan primer gen *nptII* untuk skrining tanaman tembakau transgenik pada penelitian ini dimaksudkan untuk menghindari *false positive* karena pada saat aklimatisasi tembakau transgenik di rumah kaca juga sedang berlangsung skrining ketahanan tanaman tomat terhadap *Begomovirus*. Infeksi oleh serangga vektor yang mungkin membawa *Begomovirus* ke tanaman tembakau transgenik dapat menghasilkan pita positif ketika dilakukan analisis PCR menggunakan primer untuk gen AV1.

Tanaman yang diperoleh dari hasil transformasi genetik menggunakan gen AV1 selanjutnya perlu untuk dikonfirmasi keberadaan, integrasi dan jumlah kopi dari transgen yang diintroduksi menggunakan teknik molekuler seperti teknik PCR dan *Southern Blot*, meskipun planlet-planlet merupakan planlet yang putatif transgenik karena telah lolos pada media seleksi. Selain itu, ekspresi dari gen yang sudah terintegrasi perlu diuji dengan menggunakan virus target sehingga akan diketahui tingkat efektifitas dari gen yang telah disisipkan.

KESIMPULAN

Kandidat gen AV1 dari isolat *Begomovirus* yang berukuran sekitar 780 telah dapat diamplifikasi, diklon

pada pGEM-T *easy*, ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α , dikonstruksi pada vektor ekspresi pBI121 dan ditransformasi ke dalam *A. tumefaciens*.

Transformasi genetik tanaman tembakau dengan kandidat gen AV1 menggunakan vektor bakteri *A. tumefaciens* telah menghasilkan galur-galur putatif transgenik yang membawa gen ketahanan terhadap kanamisin (gen *nptII*).

DAFTAR PUSTAKA

- Aidawati, N., S.H. Hidayat, R. Suseno, P. Hidayat, dan S. Sujiprihati. 2005. Identifikasi geminivirus yang menginfeksi tomat berdasarkan pada teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*. J. Mikrobiol. Indonesia 10:29-32.
- Aswidinnoor, H. 1995. Transformasi gen: Sumber baru keragaman genetik dalam pemuliaan tanaman. Zuriat 6(2):56-65.
- AVRDC. 2003. Centerpoint Newsletter-Spring 21(1):1.
- Bridson, R.W., M.S. Pinner, J. Stanley, and P.G. Markham. 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. Virol. 177:85-94.
- Dasgupta, I., V.G. Malathi, and Mukherjee. 2003. Genetic engineering for virus resistance. Current Sci. 8(3):341-354.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Gardiner, W.E., G. Sunter, L. Brand, J.S. Elmer, S.G. Rogers, and D.M. Bisaro. 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: The coat protein is not required for systemic spread or symptom development. Eur. Mol. Biol. Organ. J. 7:899-904.
- Hanson, P., D.M. Bernacchi, S. Green, S.D. Tanksley, V. Muniyappa, A.S. Padmaja, H.M. Chen, G. Kuo, D. Fang, and J.T. Chen. 2000. Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in cultivated tomato line. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125(1):15-20.
- Harrison, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. Ann. Rev. Phytopathol. 23:55-82.
- Hidayat, S.H., O. Chatchawankanpanich, E. Rusli, and N. Aidawati. 2006. Begomovirus associated with pepper yellow leaf curl disease in west Java, Indonesia. J. Indon. Microbiol. 11(2):87-90.
- Horsch, R., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229-1231.
- Lapidot, M., M. Friedmann, M. Pilowsky, Ben-Joseph, and S. Cohen. 2001. Effect of host plant resistance to tomato yellow leaf curl virus on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. Phytopathol. 91:1209-1213.

- Lazarowitz, S.G. and I.B. Lazdins. 1991. Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. *Virology* 180(1):58-69.
- Liu, C-A., S. Green, and P. Hanson. 2006. Development of tomato lines combining conventionally-bred virus resistance with transgenic virus resistance. 2nd ABSP II MVR Tomato Coordination and Planning Meeting. Institute of Plant Breeding, University of the Philippines, Laguna Philippines. January 10-11, 2006.
- Mason, G., M. Rancati, and D. Bosco. 2000. The effect of thiamethoxam, a second generation neonicotinoid insecticide, in preventing transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Crop Protection* 19:473-479.
- Mubin, M., S. Mansoor, M. Hussain, and Y. Zafar. 2007. Silencing of the AV1 gene by antisense RNA protects transgenic plants against a bipartite begomovirus. *Virology* 4(10):1-4.
- Pico, B., M.J. Diez, and F. Nuez. 1998. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Euphytica* 101:259-271.
- Raj, S.K., R. Singh, S.K. Pandey, and B.P. Singh. 2005. Agrobacterium-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. *Current Science* 88(10):1674-1679.
- Sanford, J.C. and S.A. Johnson. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* 115:395-405.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2, dan 3.
- Sinisterra, X.H., J.E. Polston, A.M. Abourized, and E. Hiebert. 1999. Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle Begomovirus show resistance to virus infection. *Phytopathology* 89:701-706.
- Sudiono, S.H. Hidayat, R. Suseno, and S. Sosromarsono. 2001. Molecular detection and host range study of tomato-infecting Begomovirus. *Proceeding of Indonesian Phytopathology Soc. Seminar*. Bogor. Aug 22-24, 2001. p. 208-217.
- Santoso, T.J., S.H. Hidayat, A.S. Duriat, M. Herman, and Sudarsono. 2008. Identity and sequence diversity of Begomovirus associated with yellow leaf curl disease of tomato in Indonesia. *Microbiology Indonesia* 2(1):1-7.
- Vidavsky, F. and H. Czosnek. 1998. Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* 88:910-914.
-